

学校编码: 10384

密级_____

学号: 24520071152548

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

白花前胡甲素在大鼠肝微粒体中的代谢研究

Study on the metabolism of dl-praeruptorin A in rat liver microsomes

阮 航

指导教师姓名: 朱铨副教授

专 业 名 称: 药理学

论文提交日期: 2010 年 4 月

论文答辩日期: 2010 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

目 录	I
Table of Contents	IV
摘 要	VII
ABSTRACT	IX
第一章 课题背景	1
1.1 药物代谢在研究药物相互作用的意义	1
1.2 药物代谢酶系统	2
1.3 国内外关于药物代谢的研究方法	5
1.3.1 整体试验	5
1.3.2 离体试验	6
1.4 药物代谢中常用的分析技术	8
1.4.1 色谱分析法	8
1.4.2 免疫学方法	9
1.4.3 光谱分析法	9
1.4.4 生物效应分析法	9
1.5 白花前胡甲素的研究现状	9
1.6 研究目的与实验方法	12
第二章 白花前胡甲素在大鼠血浆中的检测及药代动力学研究	14
2.1 仪器与试药	14
2.1.1 仪器	14
2.1.2 试药	14
2.1.3 实验动物	14
2.2 实验方法	15
2.2.1 色谱条件	15

2.2.2 质谱条件·····	15
2.2.3 对照品储备液和内标溶液的配制·····	15
2.2.4 标准曲线及质控样品的制备·····	15
2.2.5 血浆样品的处理·····	16
2.2.6 分析方法的验证·····	16
2.2.7 方法在药物代谢动力学中的应用：·····	17
2.3 实验结果·····	17
2.3.1 质谱分析·····	17
2.3.2 方法专属性·····	18
2.3.3 线性及最低定量线·····	20
2.3.4 日内与日间精密度和准确度·····	20
2.3.5 基质效应·····	21
2.3.6 稳定性实验·····	21
2.3.7 白花前胡甲素应用在药物动力学·····	22
2.4 讨论·····	24
2.4.1 萃取溶剂的选择·····	24
2.4.2 内标的选择·····	24
2.4.3 分析方法的选择·····	25
2.5 小结·····	25
第三章 催化白花前胡甲素体外代谢的 CYP 亚酶·····	27
3.1 实验材料·····	27
3.1.1 实验动物·····	27
3.1.2 药物及试剂·····	27
3.1.3 实验仪器·····	27
3.2 实验方法·····	28
3.2.1 溶液的配制·····	28
3.2.2 鼠肝微粒体的制备·····	28
3.2.3 肝微粒体蛋白含量的测定·····	29
3.2.4 孵育体系·····	29

3.2.5 白花前胡甲素的 CYP450 抑制实验	29
3.2.6 白花前胡甲素的 CYP450 诱导实验	30
3.2.7 白花前胡甲素的酶促动力学	30
3.3 实验结果	31
3.3.1 白花前胡甲素体外代谢的抑制效应	31
3.3.2 白花前胡甲素体外代谢的诱导效应	33
3.3.3 白花前胡甲素体外代谢的酶促参数	34
3.4 讨论	35
3.5 小结	35
第四章 鉴定大鼠肝微粒体中白花前胡甲素的代谢产物	37
4.1. 实验方法	37
4.1.1 LC/MS ⁿ 条件	37
4.1.2 分离代谢产物	37
4.2 结果	39
4.2.1 代谢物的鉴定	39
4.2.2 原药 M0	44
4.2.3 代谢物 M1	44
4.2.4 代谢物 M2, M3 和 M4	44
4.2.5 代谢途径	48
4.3 讨论	50
4.4 小结	50
第五章 结论与展望	51
附 录	53
参 考 文 献	55
硕士期间发表论文情况	62
致 谢	63

Table of Contents

Abstract in Chinese	VII
Abstract in English	IX
Chapter 1 Subject background	1
1.1 The research significance of drug metabolism	1
1.2 The system of drug metabolism enzyme	2
1.3 The research methods of drug metabolism	5
1.3.1 In vivo study.....	5
1.3.2 In vitro study	6
1.4 The common analytical technology of drug metabolism	8
1.4.1 The chromatogram analytical method.....	8
1.4.2 The immunological method.....	9
1.4.3 The spectrometric analysis method.....	9
1.4.4 The biological effect analysis method	9
1.5 The research status of dl-praeruptorin A	9
1.6 The research aims and methods	12
Chapter 2 The pharmacokinetic study of Pd-Ia	14
2.1 Instruments and reagents	14
2.1.1 Instruments.....	14
2.1.2 Reagents	14
2.1.3 Experimental animals	14
2.2 Experimental method	15
2.2.1 The chromatographic condition	15
2.2.2 The mass spectrum condition	15
2.2.3 The preparation of control stock and IS solution	15
2.2.4 Standard curve and quality control sample preparation	15
2.2.5 The treatment of plasma samples.....	16

2.2.6 The validation of analytical method	16
2.2.7 The pharmacokinetic study of dl-praeruptorin A	17
2.3 The experimental results	17
2.3.1 The mass spectrum analysis	17
2.3.2 The specificity of methods	18
2.3.3 The linear and limit of detection	20
2.3.4 The accuracy and precision	20
2.3.5 The matrix effect	21
2.3.6 The stability experiment	21
2.3.7 The application of pharmacokinetic study	22
2.4 Discussion	24
2.4.1 The selection of extract reagents	24
2.4.2 The selection of internal standard	24
2.4.3 The selection of analytical method	25
2.5 Summary	25
Chapter 3 The catalysis enzyme of in vitro metabolism	27
3.1 The experimental subject	27
3.1.1 Laboratory animals	27
3.1.2 Drugs and reagents	27
3.1.3 The experimental animals	27
3.2 The experimental methods	28
3.2.1 The preparation of solutions	28
3.2.2 The preparation of liver microsomes	28
3.2.3 The determination of protein content	29
3.2.4 The incubation system	29
3.2.5 In vitro inhibition experiment	29
3.2.6 In vitro induction experiment	30
3.2.7 The enzymatic kinetics	30
3.3 The experimental results	31

3.3.1 The inhibition effect in vitro	31
3.3.2 The induction effect in vitro	33
3.3.3 The enzymatic parameter.....	34
3.4 Discussion	35
3.5 Summary	35
Chapter 4 The identification of metabolites	37
4.1 The experimental methods.....	37
4.1.1 The condition of LC/MS ⁿ	37
4.1.2 The separation of metabolites	37
4.2 Results.....	39
4.2.1 The situation of identification	39
4.2.2 Parent drug M0.....	44
4.2.3 Metabolite M1	44
4.2.4 Metabolite M2, M3 and M4	44
4.2.5 Metabolism pathway	48
4.3 Discussion	50
4.4 Summary	50
Chapter 5 Conclusion	51
References	55
Publications.....	62
Acknowledgements	63

摘要

在临床上由于 CYP450 诱导或抑制作用,使联合用药时存在盲目性。当多种药物联合使用时,有可能导致其中一种药物发生代谢障碍或加快代谢速度,使其发生毒副反应或药物无效。药物相互作用的研究已受到了 FDA 的重视。白花前胡甲素是传统中药白花前胡的一种有效成分,拮抗 Ca^{2+} 内流、开放 K^{+} 通道,能抑制心肌细胞的凋亡,有望成为治疗和预防心血管疾病的新药。但有关白花前胡甲素药代动力学相关研究未见报。

本论文的目的在于建立一种 HPLC/ESI/MS 方法,解决以前白花前胡甲素药代动力学研究的局限;研究介导白花前胡甲素代谢的相关 CYP450 亚酶;优化 LC/MSⁿ 方法分析白花前胡甲素的代谢途径和代谢产物结构。为其今后临床安全、合理、有效应用,避免或减少不良反应发生,提供理论依据。

研究方法是地西洋为内标,建立 HPLC/ESI/MS 检测方法,测定生物样品中的白花前胡甲素。采用差速离心法制备了大鼠的肝微粒体,建立了肝微粒体体外代谢研究模型。以白花前胡甲素为底物,研究了该药在大鼠肝微粒体中的代谢行为。为了鉴定参与白花前胡甲素 I 相代谢反应的 CYP450 同工酶,考察了 CYP450 专属性诱导剂和抑制剂对该反应的影响。并探讨了白花前胡甲素体外代谢中的酶促动力学特征。采用 HPLC/ESI/MS 联用技术,研究经大鼠肝微粒体体系温孵的白花前胡甲素代谢产物。根据 LC/MSⁿ 分析并参考白花前胡甲素 ESI 质谱断裂规律,来推测它们可能的化学结构。

本文研究结果是:建立了一种快速、灵敏和特异的 HPLC/ESI/MS 方法,定量测定生物样品中白花前胡甲素的浓度。白花前胡甲素和地西洋(内标)用氯仿从生物样品中提取,用 XTerraTM RP18 柱(150 mm×4.6 mm,i.d. 5 mm)分析,分析时间小于 5.5 min,流动相甲醇:水为 75:25,流速 1 mL/min,最低定量限(LLOQ)为 2.5 ng/mL,精密度(日间和日内)小于 11.0%,准确度为 90.2–96.3%,回收率大于 79.2%,线性范围为 2.5–2500.0 ng/mL,相关系数(r^2)大于 0.999。用此种方法绘制了静脉给予大鼠白花前胡甲素后的血浆药物浓度—时间曲线,计算了其

主要药物动力学参数,评价了大鼠给药后白花前胡甲素在体内的药动学特征。

在大鼠肝微粒体中，白花前胡甲素的代谢具有酶促动力学特性，CYP3A 特异性诱导剂地塞米松和 CYP2B 特异性诱导剂苯巴比妥能显著促进白花前胡甲素的代谢反应，而 CYP3A 的特异性抑制剂酮康唑能明显抑制白花前胡甲素代谢产物的生成，并且随着酮康唑浓度增加，抑制作用增强。浓度 20 $\mu\text{g/mL}$ 的白花前胡甲素在大鼠肝微粒中孵化 15 min 后，在孵化液中，检测到白花前胡甲素的四种代谢物(M1, M2, M3 和 M4)。代谢途径主要为羟化反应。代谢产物 M1, M2, M3 和 M4 的生成均为 NADPH 依赖性氧化代谢产生的机理。

通过本论文的研究得到了以下结论：建立的 HPLC/ESI/MS 方法选择性强，灵敏度高，可作为分析检测白花前胡甲素的有效手段。CYP3A 是介导白花前胡甲素在大鼠体内生物转化的主要 CYP450 亚酶。CYP2B 也参与了该反应。白花前胡甲素与 CYP3A 酶抑制剂或诱导剂合用可能产生药物间的相互作用。

关键词：白花前胡甲素；CYP450 亚酶；代谢产物； 体外代谢； LC/ESI/MSⁿ

Abstract

DI-Praeruptorin A (Pd-Ia) is a major active constituent of the traditional Chinese medicine *Peucedanum praeruptorum* Dunn. It is a novel drug with valuable apoptosis and inflammation inhibitory effects in cardiac muscle and a novel target in the treatment and prevention of cardiovascular diseases. Many drugs are not only the substrate of the enzyme, but also the inducer or inhibitor of the enzyme or others. This may change the pharmacological and toxicological effects of drug itself or other drugs, which is one of the reasons resulting in drug interaction in pharmacokinetics. Testing for drug~drug interactions has been the subject of a FDA guidance document in 1997.

Previous pharmacokinetic studies of Pd-Ia have had limited success due to its very low plasma concentrations. In this study, we developed a new high-performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC/ESI-MS/MS) method for quantitative analysis of Pd-Ia in rat plasma. The metabolic character of Pd-Ia in rat liver microsomes was studied in vitro and in vivo to identify which isoforms of cytochrome P450 were responsible for Pd-Ia metabolism in rats, offer the theoretical foundation for the fact that it is rational to use medicine in clinic.

Set up HPLC-ESI-MS method of Pd-Ia using diazepam(internal standard) to determine concentration of Pd-Ia and its formation in rat plasma and liver microsomes incubation solution. Liver microsomes rats were prepared using ultracentrifuge method. The *in vitro* metabolism of Pd-Ia was studied by incubation with rat liver microsomes. The effects of typical CYP450 inducers and inhibitors on the metabolism of Pd-Ia were investigated. Major metabolites of Pd-Ia were investigated by liquid chromatography-electrospray ion trap mass spectrometric method. According to the chromatographic behavior and mass spectral data, the chemical structure of metabolites for Pd-Ia were identified.

In this study, we developed and validated a new rapid, sensitive and specific high-performance HPLC/ESI-MS/MS method for quantitative analysis of Pd-Ia in biological samples. Pd-Ia analyzed on an XTerra™ RP18 column were chromatographically separated within 5.5 min using methanol–water (75:25, v/v; flow rate 1 mL/min) as the mobile phase. Pd-Ia was detected in positive ion mode using multiple reaction monitoring. The method was validated and the specificity, linearity, lower limit of quantitation (LLOQ, 2.5 ng/mL), precision (intra- and inter-day <11.0%), accuracy (90.2–96.3%), recovery (>79.2%) and stability were determined. The correlation coefficient (r^2) for the linear range of 2.5–2500.0 ng/mL was >0.999. The validated method was successfully applied to pharmacokinetic studies of Pd-Ia after intravenous administration to rats. The LLOQ obtained with this method was lower than in previous studies and could be valuable for determination of Pd-Ia in therapeutic drug monitoring and preclinical studies to establish appropriate dose and frequency.

The metabolism of Pd-Ia have the characteristic of enzyme kinetics. The metabolites of Pd-Ia was produced to the great extent by microsomes from dexamethasone-induced and phenobarbital-induced rats. On the other hand, ketoconazole markedly lowered the metabolic rate of Pd-Ia in a concentration-dependent manner. Moreover, Four Pd-Ia metabolites (M1, M2, M3, and M4) were detected by incubation with rat liver microsomes. Hydroxylation was the primary metabolic pathway of Pd-Ia, and the possible chemical structures of the metabolites were also identified. The formation of M1, M2, M3, and M4 was enzymatic and NADPH– dependent.

Results suggest that the reaction is mainly catalyzed by CYP3A, CYP2B also play a role in the metabolism of Pd-Ia. Pd-Ia lie in the possibility of interaction among the medicines between CYP2B and CYP3A inducers or inhibitors when they are used in clinic.

Keyword: dl-Praeruptorina A, Cytochrome P450 isoforms, Metabolites, *In vitro*, LC-ESI-MSⁿ

第一章 课题背景

1.1 药物代谢在研究药物相互作用的意义

近年来,特非那定、阿斯咪唑、西沙必利和米拉地尔相继在市场上的撤出或被处方严格限制,表明代谢性药物相互作用已引起了广泛的重视^[1]。据估计,从1966年到1996年的30年中共39个前瞻性研究统计表明,住院患者的严重不良反应发生率为6.7%。致死性不良反应发生率为3.2%。仅1994年因此而死亡者为106000例。药物相互作用的致死率,占住院患者致死原因的第4—6位。在1980年到1998年的近20年里,先后将批准问世的13种新药从市场上撤出。其中非甾体抗炎药4个,抗高血压药和减肥药各2个,利尿药、抗心律失常药、抗抑郁药、抗组织胺药、以及抗菌药各1个。是什么原因使这些药物被撤出市场呢?就是因为陆续发现了未曾预料的严重不良反应,如2个减肥药芬氟拉明与右芬氟拉明可致心瓣膜缺损和肺动脉高压。另一个重要原因就是与其它药物合用后发生了严重的代谢性相互作用,特非那定和美贝拉地尔就属此类^[2]。从1998年开始,美国FDA要求申报新药要尽量提供体外药物相互作用的研究资料^[3],通过建立药物代谢体外模型,确定药物代谢途径及相关酶,研究药物间的相互作用,利用体外试验预测新药在体内是否发生代谢性相互作用和了解已上市同类药品的药物代谢,是当今药物代谢研究的热点之一^[4-6]。

自1829年Liebig从马尿中获得苯甲酸的代谢物马尿酸以来,人们就开始了药物代谢及机制的探求。药物进入机体发挥治疗作用的同时,机体也会给予它一系列处置。药物在体内吸收、分布及消除的同时会伴随药物化学结构上的转变,即药物的代谢过程(metabolisms),也就是药物分子在体内以不同的规模发生的生物转化(biotransformation)。药物进入机体后,代谢反应主要发生在肝脏,也可发生在其他器官或组织如肾、肺、胃肠壁、皮肤及血液等。代谢反应通常分为两种类型,即I相反应和II相反应。I相反应又称官能团反应,主要通过氧化、还原、水解、异构化等反应在药物结构中引入官能团,使之极性增大,成为更易于排泄的形式,同时也可成为II相反应的底物,II相反应又称结合反应,主要是指药物及其代谢产物继续与内源性葡萄糖醛酸、硫酸、氨基酸等结合,使之水溶性和极性增大,易于从胆汁、肾脏等组织排泄。大多数药物经代谢后药理活性降低或丧

失，称为失活过程或去活化过程。但也有一些药物经代谢转化为有药理活性的物质或活性增强，即活化过程，例如地西洋^[7]、吗啡^[8]等。有的药物被设计成前药(prodrug)形式以改善吸收或减少不良反应，即药本身无药理活性，但经过生物转化后产生具有活性的代谢产物，继而发挥疗效，例如班布特罗^[9]、头孢呋辛酯^[10]等。有些情况下，某些药物的代谢产物可能会产生与母体药物药理作用无关的生物活性，因此会发生药理作用的改变或产生毒性反应(toxicological activation)；如对乙酰氨基酚 (acetaminophen) 可经肝代谢生成有毒性的醌类代谢物，正常情况下通过与谷胱甘肽结合排出体外，但高剂量服用母体药物时，由于谷胱甘肽的耗尽，过量的代谢物可与肝脏中的大分子发生共结合，而导致肝坏死^[11]。因此药物代谢不仅直接影响到药物的血药浓度高低及代谢产物的产生，从而影响药物的疗效；而且与药物的毒副作用密切相关。

1.2 药物代谢酶系统

药物在体内发生的代谢反应的主要场所是肝脏。肝脏进行生物转化则依赖于微粒体中的多种酶系，其中最重要的是细胞色素 P450 混合功能氧化酶系统 (cytochrome P450, CYP450)。CYP450 首先 David Garfinkel 和 Martin Klingenberg 在哺乳动物的肝脏微粒体中发现。在同一动物的许多不同组织中都存在 P450，哺乳动物的肝脏是 P450 含量最丰富的器官中。虽然该酶系广泛分布于肝、肾、脑、皮肤、肺、胃肠道及胎盘等组织器官。但其分布具有一定的选择性。对大鼠的心肌组织与肝脏组织的 P450 含量进行测定，结果证明肝脏组织中的 P450 明显高于心肌组织。因此由 P450 催化的氧化还原反应可发生在体内许多部位，但仍然以肝脏为主。肝 P450 由三部分组成：血红素蛋白(P450)，黄素蛋白(NADPH-细胞色素 C 还原酶)，以及磷脂（磷脂酰胆碱），分子量约 45000-55000 道尔顿。由 P450 酶系催化的药物的生物转化是药物代谢中最重要的一个系统(如图 1.1)。代谢性相互作用的 96% 是由 P450 酶系介导。

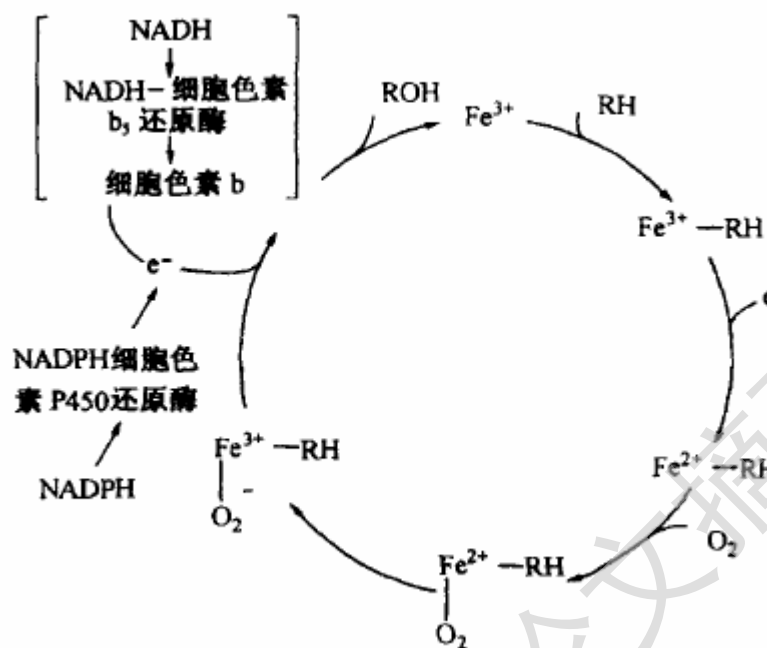


图 1.1 CYP450 的催化反应循环图。RH: 底物, ROH: 羟化代谢物

Figure 1.1 Circulation of cytochrome P450. RH: substrate; ROH: hydroxylation metabolite.

CYP450 酶系一般简称肝药酶, 1958 年从大鼠肝微粒中发现第一个 P450。由 David Garfinkel 和 Martin Klingenberg 鉴定出它在还原状态下与 CO 结合, 在波长为 450 nm 处有一最大吸收峰, 故命名之。P450 系统组成复杂, 迄今为止, 已测序和命名的 CYP450 基因已超过 3000 个。当各种 CYP450 刚刚被分离时, 人们根据其对某种特定底物的催化活性来命名, 以至于同一种酶往往有几种不同的名称, 从而引起了混乱。1993 年 Nelson 等提出了以氨基酸序列来命名 CYP450 同工酶的方法, 经修正后被广泛采用。根据这种命名方法, 凡 CYP450 基因表达的 CYP450 酶系的氨基酸同源性大于 40% 的视为同一家族 (family), 以 CYP 后标一阿拉伯数字表示, 如 CYP3, 氨基酸同源性大于 55% 为同一亚族 (subfamily), 在家族的表达后面加一大写字母, 如 CYP3A, 每一亚族中的单个 P450 酶 (individual) 则是在表达式后再加上一阿拉伯数字, 如 CYP3A4。人类已确定拥有 357 个 CYP 450 基因和 33 个假基因, 分属 18 个家族, 42 个亚家族, 各基因尚存在着大量等位基因, 大量等位基因的存在是引起 CYP450 药物氧化代

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库